

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 11-201967  
(43) Date of publication of application : 30.07.1999

---

(51) Int. Cl. G01N 33/15  
G01N 33/53  
G01N 33/68

---

(21) Application number : 10-017818 (71) Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD  
(22) Date of filing : 14.01.1998 (72) Inventor : KATO SHIGEAKI YANAGISAWA JUN

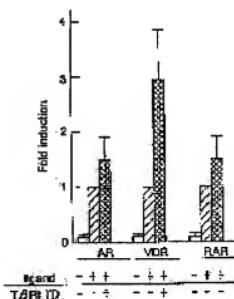
---

(54) SCREENING METHOD FOR MEDICINE AND MOLECULE DESIGN METHOD FOR MEDICINE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicine screening method and a molecule design method with high specificity.

SOLUTION: Based on knowledge that a route through an smad molecule and the route through new MAP kinase such as TAB1 and TAK1 or the like are present in the intracellular signal transmission mechanism of a TGF- $\beta$  receptor super family and the knowledge about the interaction of the smad molecule and an intranuclear receptor and the interaction with CBP/p300 in transfer adjustment by the smad molecule, these screening method and molecule design method for a medicine with higher specificity for specifying an action point are made possible.



(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-201967

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月30日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
 G 01 N 33/15  
 33/53  
 33/68

識別記号

F I  
 C 01 N 33/15  
 33/53  
 33/68

Z  
D

(21) 出願番号 特願平10-17818  
 (22) 出願日 平成10年(1998) 1月14日  
 特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年11月15日  
 日本分子生物学会発行の「第20回日本分子生物学会年会  
 プログラム・講演要旨集」に発表

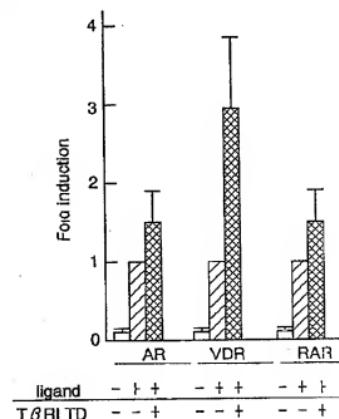
(71) 出願人 000003311  
 中外製薬株式会社  
 東京都北区浮間5丁目5番1号  
 (72) 発明者 加藤 茂明  
 埼玉県所沢市元町13-2  
 (72) 発明者 柳澤 純  
 東京都多摩市桜ヶ丘3-12-6  
 (74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外5名)

## (54) 【発明の名称】 医薬品のスクリーニング方法ならびに医薬品の分子設計方法

## (57) 【要約】

【課題】 特異性の高い、医薬品スクリーニング方法および分子設計法を提供する。

【解決手段】 TGF- $\beta$ 受容体スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達機構が、smad分子を介する経路と、TAB 1、TAK1等の新規MAPキナーゼを介した経路が存在するという知見、及びsmad分子による転写調節における、smad分子と核内受容体との相互作用、CBP/p300との相互作用についての知見に基づき、作用点を特定した、より特異性の高い医薬品のスクリーニング方法および分子設計法が可能となる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 TGF- $\beta$ ファミリー受容体からの細胞内シグナルと、核内受容体とのクロストークに基づく医薬品のスクリーニング方法。

【請求項2】 TGF- $\beta$ ファミリー受容体からの細胞内シグナルと、核内受容体とのクロストークを促進する医薬品のスクリーニング方法。

【請求項3】 TGF- $\beta$ ファミリー受容体からの細胞内シグナルと、核内受容体とのクロストークを阻害する医薬品のスクリーニング方法。

【請求項4】 核内受容体と、smad分子との相互作用に基づく医薬品のスクリーニング方法。

【請求項5】 前記smad分子との相互作用を、Two-Hybrid Systemを用いて検出することを特徴とする請求項4に記載の医薬品のスクリーニング方法。

【請求項6】 前記smad分子との相互作用を、抗原抗体反応を用いて検出することを特徴とする請求項4に記載の医薬品のスクリーニング方法。

【請求項7】 転写共役因子と、Smad分子との相互作用に基づく医薬品のスクリーニング方法。

【請求項8】 前記転写共役因子が、CBP及び/又はp300であることを特徴とする請求項7に記載の医薬品のスクリーニング方法。

【請求項9】 核内受容体と、Smad分子と、転写共役因子との相互作用に基づく医薬品のスクリーニング方法。

【請求項10】 前記転写共役因子が、CBP及び/又はp300であることを特徴とする請求項9に記載の医薬品のスクリーニング方法。

【請求項11】 前記核内受容体が、ビタミンD受容体であることを特徴とする請求項1～10のいずれか1項に記載の医薬品のスクリーニング方法。

【請求項12】 前記Smad分子がSmad3であることを特徴とする請求項1～11のいずれか1項に記載の医薬品のスクリーニング方法。

【請求項13】 請求項1～12のいずれか1項に記載の、Smad分子と、核内受容体及び転写共役因子であるCBP/p300との結合部位の立体構造に基づく医薬品の設計方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、硬骨、軟骨、肝、腎、皮膚、免疫、中権等の各種疾患や良性・悪性腫瘍・過形成・線維化等に対する有効な医薬品スクリーニング方法ならびに医薬品の分子設計に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの作用に着目し、TGF- $\beta$ スーパーファミリー分子そのもの、あるいはそれらのアゴニスト又はアンタゴニストを医薬品として開発しようとする試みがなされており、そのための医薬品検索スクリーニング方法もいくつか知られている。

る。

【0003】 例えば、(1) 細胞系を用いたスクリーニング方法としては、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの有する動物細胞に対する増殖、分化、細胞死又は細胞生存維持活性を指標としたアゴニストやアンタゴニストの検索方法である。具体的には、(i)TGF- $\beta$ による腫瘍細胞の増殖抑制活性あるいは別の腫瘍細胞を用いた増殖促進活性を指標にしたスクリーニング方法、(ii)TGF- $\beta$ の免疫抑制作用に着目したスクリーニング方法、又は(iii)TGF- $\beta$ の細胞外マトリックスの産生促進効果に着目したスクリーニング方法等がある。さらに、(2)TGF- $\beta$ スーパーファミリーとTGF- $\beta$ 受容体スーパーファミリーとの相互作用に着目したスクリーニング方法も知られている。

【0004】 しかし、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの作用は極めて多岐に渡ることが知られており、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに対する単なるアゴニスト又はアンタゴニストでは主作用と副作用との分離が十分でなく、従って医薬品のスクリーニング方法としては十分でないという問題がある。すなわち、上記スクリーニング方法には、主作用のみを分離することができず、医薬品候補とはなりえない特異性の低い物質が検索される可能性が高い。また、仮に有用な医薬品候補が見出されてもその後より有用な物質を誘導体合成するための方向性を見出すことや分子設計が不可能であるという問題があった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来技術の問題点を解消し、係る問題点の少ない医薬品の新規スクリーニング方法を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の問題点を解決するため鋭意研究を重ね、TGF- $\beta$ 受容体スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達機構に着目した新規な原理に基づき、より特異性の高い医薬品（阻害剤、促進剤等）のスクリーニング方法ならびに分子設計方法を開発することに成功し、本発明を完成するに至ったものである。

【0007】 TGF- $\beta$ 受容体スーパーファミリーの細胞内伝達機構としてはsmad分子を介する経路と、TAB1、TAK1等を介したMAPキナーゼ経路とが知られていたが、最終的にこれらの経路により標的遺伝子の発現がどのように制御されているかについては殆ど分っていなかった。とりわけsmad分子は核内で転写制御に関わることが知られているが、高等動物細胞においてはsmad分子と相互作用する転写調節因子は不明であった。

【0008】 本発明者は、smad分子の転写制御機序のうち、極めて生理的に重要なsmad分子と核内受容体ならびに転写共役因子との相互作用を明らかとした。係る知見に基づき、TGF- $\beta$ 受容体スーパーファミリーの細胞内情報伝達機構を介した転写制御機序に着目するという新規な原理に基づく医薬品のスクリーニング方法な

らびに分子設計方法を開発したものである。

【0009】因みに、smadのシグナル伝達経路において、従来技術から推定可能な薬剤作用としては、(i)smad2,3等へのリン酸化(核移行能獲得)、(ii)smad分子間のダイマー形成、(iii)smad6,7等の本シグナル伝達経路の阻害因子の発見又は機能調節があるが、これらは細胞質で生じるものであり核内で生じるものではなく、かつ、良く保存された経路であることから、係る作用に基づく医薬品のスクリーニング方法は特異性の高い医薬品の検索には適さない。また、(ii)を除けば具体的な分子間相互作用が明らかとなっていないことから、構造に基づいた理論的な分子設計のアプローチは不適である。

【0010】一方smad分子による転写調節について、本発明者は、smad分子と核内受容体との相互作用やCBP/p300との相互作用について知見を得、smadの具体的なパートナーを明らかにし、係る知見に基づいて、作用点を特定した、より特異性の高い薬剤のスクリーニング方法を開発するに至った。係る方法に基づいて有用な医薬品候補を見出し、さらにより有用な物質を合成するための方向性や分子設計が可能となる。すなわち、係る知見に基づき、通常公知の手法であるX線による結晶構造解析や、NMR(核磁気共鳴)法による解析の手法や数値計算によるモデリングを用いて容易に医薬品の設計が可能となるものである。

【0011】さらに、上記原理に基づき、核内受容体(例えばビタミンD受容体)のより特異性の高いアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング方法の開発を可能とする。すなわち、核内受容体が多く組織に分布していることから、従来の單にこれを標的としてスクリーニングされたアゴニストやアンタゴニスト性医薬品は何等かの副作用が避けられなかつた。しかし、本発明に係る、smad分子と核内受容体との相互作用に着目すれば、smadを転写共役因子として用いている特異的な転写調節のみを阻害ないし促進することが可能となり、従来の核内受容体のアゴニスト・アンタゴニストの有用性に加え、効果・特異性に優れた薬剤(骨、皮膚、肝臓、腎臓、免疫、中枢等の各種疾患や各種臓器、組織における良性、悪性腫瘍、過形成、線維化など)が対象)の検索が可能となる。

【0012】すなわち、本発明におけるsmad分子と核内受容体やCBP/p300との相互作用の新規知見に基づき、新規治療薬を開発する方法を提供するものである。

【0013】以下、本発明を実施の形態に即し詳細に説明する。

【0014】

【発明の実施の形態】TGF- $\beta$ やBMPといったTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する一連の因子の生理作用は非常に多様であり、硬骨、軟骨、肝、腎、皮膚、免疫等の各種疾患や癌において増悪因子あるいは改善因子として作用している。一方、ビタミンD、レチノイン酸、ステロイ

ドホルモンとそれら受容体(核内受容体/ステロイドホルモン受容体 スーパーファミリー)を介した作用も多岐に渡っており、その様の組織の一部は上記TGF- $\beta$ スーパーファミリーの標的組織と重なっている。

【0015】本発明者は、TGF- $\beta$ の細胞内シグナルが核内受容体の転写抑制に影響を与えること、その作用はTGF- $\beta$ の細胞内シグナル伝達分子Smadを介して発揮されること、特にVDRの転写活性化に対してはSmad3が転写共役因子として作用し、VDRとCBP/p300との相互作用を介在していることを見出した。

【0016】さらに、本発明者は、Smad3が、ほとんど全ての核内受容体の転写活性化に必須と考えられている転写のintegratorであるCBP/p300と直接結合することを見出し、TGF- $\beta$ 細胞内シグナルと広範囲の核内受容体転写調節とのクロストークの分子レベルでの実体を解明した。

【0017】TGF- $\beta$ 細胞内シグナルと核内受容体転写調節のクロストークの実体が解明されたことより、TGF- $\beta$ と核内受容体、特にVDRが関与する疾患治療薬の創出のために、これまでと全く異なるアプローチが可能となつた。

【0018】すなわち、TGF- $\beta$ の細胞内シグナルと核内受容体転写活性に影響を与える薬剤にはこれまでの治療薬に無い組織特異性と効果面での改善と、及び分子間相互作用を基盤とした各種スクリーニング系の構築が可能となる。従ってこれらに基づくスクリーニング方法により見出される物質には、硬骨、軟骨、肝、腎、皮膚、免疫、中枢等の各種疾患や良性又は悪性腫瘍、過形成、線維化等に対する有効な治療薬が含まれ得る。

【0019】TGF- $\beta$ が細胞内シグナル伝達にSmad2 or 3とSmad4を用いるのに対し、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属するBMPは細胞内シグナルに構造類似のSmad1-Smad4を用いる。本発明は主としてTGF- $\beta$ 、Smad3、CBP/p300、各種核内受容体を用い、新規スクリーニング方法を提供するものであるが、係る方法はBMP、Smad1に対しても共通な部分を含むことが容易に類推できる。

【0020】Smad3がCBP/p300と直接結合することから、核内受容体以外の転写活性化因子(CREBP, AP-1等)の転写活性調節物質のスクリーニングにも、本スクリーニング法は適用可能である。

【0021】以下、本発明に係る医薬品のスクリーニング方法を具体的に説明する。

【0022】スクリーニング方法(I)。

本発明者の見出した知見に基づき、TGF- $\beta$ ファミリー受容体からの細胞内シグナルと核内受容体とのクロストークと、このクロストークに影響を与える物質をスクリーニング(検索)することが可能となる(実施例1参照)。

【0023】スクリーニング方法(II)。

Two-Hybrid Systemを用いてスクリーニングが可能とな

る。核内受容体とsmad分子との相互作用(結合)に影響を及ぼす物質の検索(スクリーニング)には「Two-Hybrid System」(Gyuris, J., Cell, 1993, 75: 791-803; Golemis, E. A., Current Protocols in Molecular Biology [John Wiley & Sons, Inc.], 1996, Ch. 20.0 and 20.1)を用いることが可能である。

【0024】「Two-Hybrid System」に用いる転写活性化ドメインとしては、例えば、GAL4の転写活性化ドメイン(Brent, R., Cell, 1985, 43: 729-736)、[BcIod], [c-Fos], [c-myc], [v-Myc], [B6], [B7], [B42](Golemis, E. A., Mol. Cell Biol., 1992, 12: 3006-3014)、または[VP16](CLONTECH社, Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit)などが挙げられる。

【0025】また「Two-Hybrid System」に用いるDNA結合ドメインとしては、例えば、GAL4(Giniger, E., Cell, 1985, 40: 767-774), p53(Chumakov, P. M., Genetika, 1988, 24: 602-612), GCN4(Henninghush, A. G., Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81: 6442-6446), VP16(Triezenberg, S. J., Genes Dev., 1988, 2: 718-729)、ReloA(Nolan, G. P., Cell, 1991, 64: 961-969)、Oct-1(Strum, R. A., Genes Dev., 1988, 2: 158-2-1599)、c-Myc(Watt, R., Nature, 1983, 303: 725-728)、c-Jun(Angel, P., Cell, 1988, 55: 875-885)、MyoD(White, W. E., Cell, 1989, 56: 607-617)などの転写因子において同定されている。

【0026】「Two-Hybrid System」を用いて蛋白質A、Bの結合に影響を与える物質を検索する原理は概ね以下の通りである。上記の転写活性化ドメインと蛋白質Aとの融合蛋白の発現ベクター、上記DNA結合ドメインと蛋白質Bとの融合蛋白の発現ベクター、適当なレポーター遺伝子からなる発現ユニットを核内に保持する真核生物宿主を準備する。レポーター遺伝子は両融合蛋白質が結合した際に活性化されるプロモーター領域と該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子とからなる発現ユニットとして構築される。

【0027】該レポーター遺伝子の発現を検出し、発現量に影響を与える物質を選択することで蛋白質A、Bの結合に影響を与える物質を検索することが可能である。

【0028】発現ベクターとしては、真核生物宿主内で「(1)上記転写活性化ドメインと核内受容体ないしsmadをコードするDNAとの融合DNA、(2)上記DNA結合ドメインと核内受容体ないしsmadをコードするDNAとの融合DNA」にコードされる蛋白質が安定的に発現できるものであれば特に制限はない。また核内受容体としてはVDRが望ましいが他のRAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、PPAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、ER、AR、PgR、GR等の核内受容体/ホルモン受容体の利用を制限するものではない。また核内受容体をコードするDNAとしてはリガンド/ホルモン結合ドメインをコードするDNAを有していれば利用可能である。smad分子としてはsmad3が望ましいがsmad2や他のsmadファミリーに

属する分子をコードするDNAの利用を特に制限するものではない。

【0029】レポーター遺伝子の発現ベクターとしては、両融合蛋白質が結合した際に活性化されるプロモーター領域と該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を含み、両融合蛋白質が結合した際にレポーター遺伝子産物を特異的かつ効率的に発現できるものであれば特に制限はない(実施例2参照)。

【0030】スクリーニング法(III)

抗原抗体反応を用いてスクリーニングすることが可能となる。細胞内Csmad分子と核内受容体を発現させ、一定時間被検物質と共に培養した後、細胞を破碎して細胞溶解放液を調製する。一方の分子に対する抗体で免疫沈降させ、沈殿中に含まれる他方の分子を免疫学的方法で検出しない定量することで、被検物質の両分子(smad-核内受容体)相互作用(結合)に及ぼす影響を検出することが可能である。両分子の結合を誘導する物質の検索は、上記培養系に被検物質を単独で添加し、上記実験を行い被検化合物を含まない細胞からの免疫沈降物と比較することで容易に成される。また、両分子の結合を修飾(促進あるいは抑制)しない阻害する物質は、上記培養系に核内受容体の適当なアゴニスト/ホルモンと被検物質とを同時に添加して上記実験を行い、被検化合物を含まない細胞からの免疫沈降物と比較することで検索ができる。

【0031】smadおよび核内受容体はFLAG-、HA-、His-、免疫グロブリンのFc部分、GST-、GFP等のtagないし標識蛋白/ペプチドとの融合蛋白として発現させて用いることも可能であり、その際免疫沈降あるいは免疫学的検出に用いる抗体はそれらtagを認識する抗体であってもかまわない。また、抗体による免疫沈降の代わりに、ビーズ等の固形基にNiやグルタチオンを固定化して目的蛋白質複合体を補足することも可能である。さらに、目的蛋白質の検出にあたっては融合させたtag/標識蛋白質/ペプチドの特性を利用して、その酵素活性や蛍光活性による検出も可能である。核内受容体としてはリガンド結合ドメインのみ、あるいはリガンド結合ドメインを含む任意の融合蛋白の使用も可能である。

【0032】免疫沈降物ないし上記に述べた方法で得たsmad-核内受容体複合体から、目的蛋白質を検出あるいは定量する際、SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動により複合体より分離してウェスタンプロットにより検出することが出来る。また、ELISAやRIAによる定量も可能である。

【0033】簡便な実験法として、ELISAプレートやビーズに一方の蛋白質分子ないし融合蛋白質分子を認識する抗体、Ni、グルタチオン等を固定し、上記細胞溶解放液中のsmad-核内受容体複合体を補足し、他方の蛋白分子を認識する抗体等を用いて、補足された複合体中の目的蛋白質分子を検出・定量することが出来る。検出には

通常行われているごとく、酵素やラジオアイソトープ等の標識抗体を用いた直接定量法や、標識された2次抗体を用いた間接定量法、あるいはビオチン標識した抗体を用いた標識アビジョンにより定量するビオチン - アビジョン法等を用いることが出来る。また、一方の蛋白質分子を GFP の様な蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現させれば、他方の分子を認識する抗体等で固層に Smad - 核内受容体複合体を補足した後、直接蛍光活性を測定することで Smad と核内受容体との相互作用（結合状態）を評価することが出来る（実施例3参照）。

#### 【0034】スクリーニング法(IV)

Smad - 核内受容体相互作用に基づき該作用に影響を与える物質を無細胞系においてスクリーニングすることが可能となる（実施例4参照）。

#### 【0035】スクリーニング法(V)

転写共役因子と Smad 分子の相互作用を検出することによりスクリーニングすることが可能となる。CBP と P300 は核内受容体を含む多くの転写調節因子からの転写活性化を介在する転写共役因子として機能している。VDR は CBP / P300 と直接結合しないが、以下に述べる結果より Smad3 介して VDR と CBP / P300 が結合することが明らかとなつた。

【0036】そこで、Smad 分子と核内受容体による転写制御に影響を及ぼす物質を検索する上で、Smad 分子と CBP / P300 との結合への作用も十分考慮する必要がある。そこで、以下の実施例を応用することで Smad 分子と CBP / P300 との結合に影響を与える物質の検索系が容易に構築可能である。

【0037】一方、ドミナントネガティブな Smad3 を用いた実験から、Smad3cAMP、ホルボールエーステル、PDGF からの転写調節筋に促進的に作用することが示唆されている (Istvan Mucsi, et al., BERC, 232, 517-521, 1997)。しかし、その作用機序は不明であり、このような Smad3 の多岐に渡る作用を修飾する物質を検索することは困難であった。本発明により、これら多岐に渡る Smad3 を介した作用が Smad 分子と CBP / P300 との相互作用として統一的に理解されることから、先に述べた両分子の結合に影響を与える物質の検索系が構築可能となつた。

【0038】スクリーニング方法としては GST - Smad 融合分子と標識 CBP / P300 を用いた GST - プルダウン法（前項に記載した方法）を用い、両分子を反応させた際に、被検物質を反応系に加えることで、両分子の結合を修飾する物質を見出しが可能である。また GST - CBP および GST - P300 融合蛋白質と標識 Smad 分子とを用いた GST - プルダウン法も可能である。

【0039】なお、GST - プルダウン法に限らず、蛋白質間の相互作用（結合）を測定する系であれば、目的とする Smad 分子と CBP / P300 との相互作用を促進あるいは抑制する物質の検索は可能である。そのような測定系としては、細胞系も無細胞系も可能であり、ELISA、RIA、SP

A 法、BIACORETM、蛍光偏光法、Two-Hybrid System などが容易に推定される。また、Smad 分子と CBP / P300 分子についてはそれぞれの部分ペプチドであっても実施可能である。さらに Smad および CBP / P300 分子ないしそれぞれの部分ペプチドは FLG - 、 IIA - 、 IIIa - 、免疫グロブリンの Fc 部分 - 、 GST - 、 GFP 等の tag ないし標識蛋白 / ペプチドとの融合蛋白質として用いることも可能である。

#### 【0040】

【実施例】以下、実施例を挙げてこの発明を詳細に説明するが、この発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0041】（実施例 1） TGF- $\beta$  のシグナルを構成的に細胞内に伝達するため、構成的に活性な変異 TGF- $\beta$  type I 受容体 (T $\beta$  RI-TD) をコードする遺伝子を高等動物発現ベクターに挿入した。TbetRI-I TD を使用した。

【0042】アンドロゲン受容体 (AR) をコードする遺伝子、ビタミン D3 受容体 (VDR) をコードする遺伝子、レチノイン酸受容体 (RAR) をコードする遺伝子を、それぞれ高等動物発現ベクター - pSG5 に挿入し、それぞれの受容体の発現プラスミドを構築して (pSG5-AR, pSG5-VDR, pSG5-RAR) 実験に供した。比較のために、それぞれの発現ベクターのみを用いた。

【0043】レポーター遺伝子発現プラスミドはそれぞれのホルモン受容体 / 核内受容体に対応する応答配列を C AT レポーター遺伝子発現ベクターに挿入して用いた。

【0044】実験にはフェノールレッド不含有の Dulbecco's modified Eagle's medium - 5% dextran-coated 活性炭処理牛胎児血清にて培養維持した COS-1 細胞を用いた。10 cm 陥れ皿で培養した Cos-1 細胞を用い、細胞が 40-50% の飽和密度に達した時点で、上記のプラスミドを目的に応じて組み合わせ、総量 20  $\mu$ g をリシン酸カルシウム共沈法にて細胞に遺伝子導入した。また内部対照として  $\beta$  ガラクトシダーゼ 遺伝子の発現ベクター - pCH110 (Promega) も 3  $\mu$ g 同時に導入し、その発現量で各ベトリ皿間の遺伝子導入効率の違いを補正した。テストステロン、1,25(OH)2VD3、レチノイン酸等の各種被検物質は遺伝子導入 1 時間後にそれぞれのベトリ皿に添加し、以後培地交換の際にも同様に添加した。

【0045】遺伝子導入 24 時間後に細胞を新鮮な培地で洗い、その後 24 時間培養を継続した。細胞を凍結融解にて破砕し細胞抽出液を調製し、CAT 測定を行い、同時に  $\beta$  ガラクトシダーゼ 活性を測定して結果を補正した。

【0046】その結果、テストステロン、レチノイン酸添加による AR、RAR を介した転写活性は TGF- $\beta$  からのシグナルによりやや増強された。1,25(OH)2VD3 添加による VDR を介した転写活性は TGF- $\beta$  からのシグナルにより強く増強された (図 1)。この結果より、TGF- $\beta$  の細胞内シグナルがホルモン受容体 / 核内受容体の転写活性に影響を与える（増強する）ことが示された。

【0047】この実験系を用いることにより、TGF- $\beta$

の細胞内シグナルによるホルモン受容体/核内受容体の転写活性制御機構に作用する物質の検索が可能である。

【 0 0 4 8 】 すなわち、TGF- $\beta$ シグナルの存在下、非存在下にテストステロン、1,25(OH)2VD<sub>3</sub>、レチノイン酸等の生理的なリガンドの代わりに、もしくは同時に各種被検物質をこの系に添加し、それぞれの受容体の転写活性を比較することで、TGF- $\beta$ シグナル-核内受容体相互作用への依存度の異なるホルモンアゴニストやアンタゴニストの検索が可能である。また、同様にTGF- $\beta$ シグナル-核内受容体相互作用の促進剤や抑制剤の検索も可能である。

【 0 0 4 9 】 ( 実施例 2 )

高等動物細胞を用いた two-hybrid analysis

COS-1細胞をフェノールレッド不含のDulbecco's modified Eagle's medium-5% dextran-coated活性炭処理牛胎児血清にて培養維持した。実験には10cm径ベトリ皿で培養した細胞を用い、細胞が40-50%の飽和密度に達した時点で、以下のプラスミドを総量20 $\mu$ gをリン酸カルシウム共沈法にて細胞に遺伝子導入した。また内部対照として $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子の発現ベクターpCH110(P-harmacia)3 $\mu$ gも同時に導入し、その発現量で各ベトリ皿間の遺伝子導入効率の違いを補正した。VD<sub>3</sub>等の各種被検物質は遺伝子導入1時間後にそれぞれのベトリ皿に添加し、以後培地交換の際にも同様に添加した。遺伝子導入24時間後に細胞を新鮮な培地で洗い、その後24時間培養を維持した。細胞を凍結融解にて破砕し細胞抽出液を調製し、CAT測定を行い、同時に $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定して結果を補正した。

【 0 0 5 0 】 two-hybrid analysisのためのプラスミドとして、VDRのD,E,Fメイインをコードする遺伝子をpM(ClonTech)ベクターに挿入しGAL4 DNA-binding domain-VDR(DEF)融合蛋白の発現プラスミドを構築した。また、smad2と3をコードする遺伝子をpVP16(ClonTech)ベクターに挿入しVP16-smad2あるいはVP16-smad3融合蛋白の発現プラスミドとして用いた。リポーター遺伝子発現プラスミドとしては17M5 (GAL-4の認識サイトUAS 17mer x5回含む)にCAT遺伝子を挿入した17M5-CATを用いた。これらの発現プラスミドを上記のようにCOS-1細胞に導入した。

【 0 0 5 1 】 GAL4 DNA-binding domain - VDR(DEF)とVP-16 - Smad2あるいはVP-16 - Smad3を発現した細胞において、1 $\alpha$ , 25(OH)2VD<sub>3</sub>存在下に比較して1nMの1 $\alpha$ , 25(OH)2VD<sub>3</sub>存在下に強いCAT活性の増加が検出された(図2)。Smad3とVDRとが1 $\alpha$ , 25(OH)2VD<sub>3</sub>存在下に結合することが示された。

【 0 0 5 2 】 この実験系を用いることによりSmad3とVDRとの相互作用を増強する物質の検索が可能である。また1 $\alpha$ , 25(OH)2VD<sub>3</sub>等のVD<sub>3</sub>アゴニスト存在下に認められるSmad2あるいはSmad3とVDRとの結合に対して阻害作用を示す物質の検索も可能である。

【 0 0 5 3 】 ( 実施例 3 )

免疫沈降法 - 免疫プロッティング法

実施例1と同様にCOS-1細胞に以下の2種類の発現プラスミドを導入した。遺伝子導入1時間後にそれぞれのベトリ皿に1,25(OH)2VD<sub>3</sub>を0nM(非添加)あるいは1nM添加し、以後培地交換の際にも同様に添加した。遺伝子導入24時間後に細胞を新鮮な培地で洗い、その後24時間培養を維持した。培養した。(1)VDR遺伝子を高等動物発現ベクター-pSG5に挿入したpSG5-VDR、(2)FLAG-tagged Smad3遺伝子を高等動物発現ベクター-pcDNA3 (Invitrogen)に挿入したプラスミド。細胞を溶解し、抗FLAGモノクローナル抗体M2(1IB1; Eastman Kodak)で免疫沈降した後、8% SDS-ポアリクリアスミドゲル電気泳動により共沈した蛋白質を分離した。泳動蛋白質をPVDF膜(Bio-Rad)に転写し、ウサギ抗VDR抗体とアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体(Promega)でVDRを検出した。

【 0 0 5 4 】 その結果、1,25(OH)2VD<sub>3</sub>非添加細胞からは殆どVDRは検出されなかった。一方、1,25(OH)2VD<sub>3</sub>添加細胞からは明瞭なVDRのバンドが検出された(図3)。

【 0 0 5 5 】 この実験法を用いることで、smad3 - VDRとの相互作用(結合)を促進する物質の検索が可能である。また、1,25(OH)2VD<sub>3</sub>等のアゴニスト存在下に、各種物質をこの培養系に添加すればsmad3 - VDRとの相互作用(結合)を抑制する物質の検索が可能である。

【 0 0 5 6 】 ( 実施例 4 ) VDRとSmad分子の相互作用検出系 - GST-ブルグマン分析-

GSTを融合させたsmad3ないしVDR(全長1-424、部分ペプチド: アミノ酸配列115-424、115-357、115-300、図4参照)融合蛋白質(GST-Smad3ないしGST-VDR)を大腸菌にて発現させ、グルタチオンセファロースビーズ(Pharmacia)を用いてビーズに捕捉しアフィニティー精製した。一方35S-メチオニンでラベルしたsmad3およびVDRを網状赤血球ライゼット翻訳系(Promega)を用いて無細胞系で調製した。先のビーズに固層化されたGST-Smad3ないしGST-VDRと35S-メチオニンでラベルしたVDRないしsmad3をインキュベートした。ビーズに結合した35S-メチオニンでラベルしたVDRないしsmad3をSDS - ポアリクリアミドゲル電気泳動により解析した。

【 0 0 5 7 】 その結果、VDRの部分ペプチド115-357、115-300がSmad3と結合することが明らかとなった。この結合に1,25(OH)2VD<sub>3</sub>は不要であった。また、全長のVDRは1nMの1,25(OH)2VD<sub>3</sub>存在下に弱くSmad3と結合した(図5)。

【 0 0 5 8 】 細胞系での1,25(OH)2VD<sub>3</sub>の効果との乖離は、細胞系においては1,25(OH)2VD<sub>3</sub>存在下に核内受容体転写共役因子(SRC-1/TIF1ファミリー蛋白質)とVDRのC末端付近のAF-2コアドメインとが相互作用する結果、VDRの構造が変化し、VDRのEドメイン中央部の部分ペプチド(アミノ酸115-357、115-300)がSmad分子と相互作用(結合)可能となるためと考えられた。無細胞系では転

写共役因子が存在しないため、1,25(OH)2D3を反応系に添加しても全長のVDRとSmad分子との強い結合は観察されない。

【0059】VDR(115-300)やVDR(115-357)がSmad3との結合部位を含むVDR部分ペプチドであることから、GST-VDR(115-300)ないしGST-VDR(115-357)と標識Smad3を用いたGST-ブルダウン実験系に被検物質を添加することで、VDR-Smad相互作用(結合)を促進あるいは抑制する物質を選択する事が可能である。

【0060】なお、GST-ブルダウン法に限らず、蛋白質間の相互作用(結合)を測定しある系であれば、目的とするSmad分子と核内受容体分子との相互作用を促進あるいは抑制する物質の検索は可能である。そのような測定系としては、ELISA、RIA、SPA法、BIACORETM、蛍光偏光法などが容易に推定される。また、Smad分子と核内受容体分子についてはそれぞれの部分ペプチドであっても実施可能である。

【0061】さらにSmadおよび核内受容体分子ないしそれぞれの部分ペプチドはPLG-、HA-、His-、免疫グロブリンのFc部分-、GST-、GFP等のtagないし標識蛋白/ペプチドとの融合蛋白質として用いることも可能である。

#### 【0062】(実施例5)

Smad分子とCBP/p300との相互作用の検出 — GST-ブルダウン法 —  
GSTを融合させたSmad3融合蛋白質(GST-Smad3)を大腸菌にて発現させ、グルタチオン-セファロースビーズ(Pharmacia)を用いてビーズに捕捉しアフィニティー精製した。一方35S-メチオニンでラベルしたCBPおよびp300を網状赤血球ライゼット細胞系(Promega)を用いて無細胞系で調製した。先のビーズに固着化されたGST-Smad3と3

5S-メチオニンでラベルしたCBPないしp300をインキュベートした。ビーズに結合した35S-メチオニンラベルCBPないしp300をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後オートラジオグラフィーにより解析した。その結果、Smad3にCBPおよびp300が直接結合することが示された(図6(A)及び(B))。

【0063】この実験系において、GST-Smad3と35S-メチオニンラベルCBPないしp300とを反応させる際に、両分子の結合を促進あるいは抑制する物質を共存させると、最終結果のオートラジオグラフィーのCBPないしp300のバンドが増大あるいは減弱する。この様な変化を指標にSmad3とCBP/p300との相互作用を修飾(促進あるいは抑制)する物質の検索が可能である。

#### 【0064】

【発明の効果】TGF- $\beta$ スーパーファミリー刺激によるTGFB受容体スーパーファミリーからの細胞内情報(シグナル)伝達機構が、Smad分子を介して核内受容体や転写調節因子CBP/p300による転写制御とクロストークしているという新規な原理に裏打ちされて、このクロストークに着目するという新規な原理に基づくより特異性の高い医薬品(阻害剤、促進剤)のスクリーニング方法が可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の結果を示す図である。

【図2】実施例2の結果を示す図である。

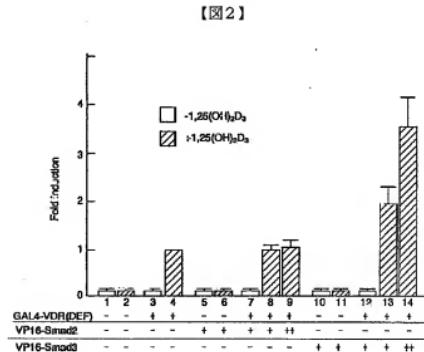
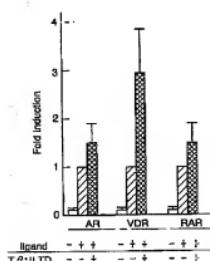
【図3】実施例3の結果を示す電気泳動写真である。

【図4】実施例4の結果を示す図である。

【図5】実施例4の結果を示す図である。

【図6】(A)は、実施例3の結果(p300について)を示す電気泳動写真であり、(B)は、実施例3の結果(CBPについて)を示す電気泳動写真である。

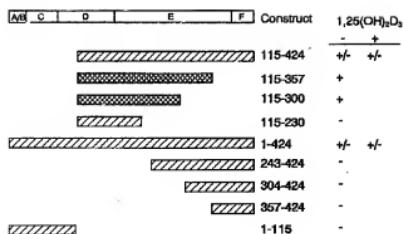
【図1】



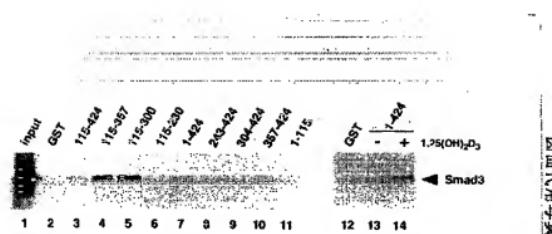
【図3】



【図4】



【図5】



図面代用写真

【図6】

図面代用写真

(A)

(B)

